

TRABAJO DE FIN DE GRADO

FACULTAD DE FARMACIA

**PLANTAS CANARIAS CON POTENCIAL
PLAGUICIDA: INTEGRANDO LA
INVESTIGACIÓN Y EL SABER POPULAR**

PAULA LIMA CABRERA

JUNIO 2022

Tutora: Dra. Isabel López Bazzocchi.
Cotutora: Dra. Carolina Pérez Reyes.



La Dra. Dña. ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI y el Dra. Dña. CAROLINA PÉREZ REYES, como tutores de la presente Memoria:

AUTORIZAN:

A la alumna Paula Lima Cabrera, a la presentación y defensa del Trabajo de Fin de Grado titulado “Plantas Canarias con potencial plaguicida: integrando la investigación y el saber popular”, para optar al Grado en Farmacia por la Universidad de La Laguna.

Fdo.: Dra. Dña. Isabel López Bazzocchi

Fdo.: Dra. Dña. Carolina Pérez Reyes

ÍNDICE

SUMMARY/RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Plaguicidas.....	5
1.2. Plaguicidas naturales.....	5
1.3. Productos naturales.....	7
1.4. Flora endémica canaria.....	7
1.4.1. Género <i>Salvia</i>	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	16
5. MATERIAL Y MÉTODO.....	17
5.1. Recolección de material vegetal.....	17
5.2. Extracción y fraccionamiento de las hojas de <i>Salvia canariensis</i> L.....	17
5.3. Fraccionamiento cromatográfico.....	17
5.4. Datos espectroscópicos.....	18
5.5. Técnicas experimentales.....	19
5.5.1. Espectroscópicas y espectrométricas.....	19
5.5.2. Técnicas cromatográficas.....	19
5.6. Programas informáticos.....	20
5.7. Ensayos biológicos.....	20
6. BIBLIOGRAFÍA.....	21
7. ANEXO: ESPECTRO DE RMN.....	23

SUMMARY

Population increase in recent decades and the consequent increase in the demand for food by this population, has brought with it the need to obtain more efficient crops, with higher productivity, and resistant to pests and environmental factors that may affect them.

One way to increase productivity consists in reducing losses caused by pests, mainly through the use of synthetic pesticides. The adverse effects of these pesticides - in spite of their efficacy -, have also awakened the urgent need to search for less harmful alternatives to these pesticides.

In this work, we try to validate the traditional knowledge based on experience with the use of “salvia” as a pesticide. To achieve this, we have separated, by chromatographic techniques, different metabolites from the leaves of the *S. canariensis* L. and elucidated the structure of the major product by spectroscopic techniques, in order to determine its possible fungicidal effect, with the aim to investigate its potential application as a more respectful pesticide for humans and the environment.

RESUMEN

El aumento significativo de la población en las últimas décadas y el consiguiente incremento de la demanda de alimentos para esta población, ha traído consigo la necesidad de obtener cultivos más eficientes, con mayor productividad, y resistentes a las plagas y factores ambientales que puedan afectarle negativamente.

Una estrategia para aumentar la productividad ha consistido en reducir las pérdidas causadas por plagas, principalmente, mediante el uso de plaguicidas sintéticos. Los múltiples efectos adversos de estos - a pesar de su eficacia -, ha suscitado la urgente necesidad de buscar alternativas menos perjudiciales.

En este TFG, pretendemos validar el saber tradicional basado en la experiencia con el uso de “salvia” como plaguicida. Para ello, hemos separado, por medio de técnicas cromatográficas, diferentes metabolitos de las hojas de la especie *Salvia canariensis* L. y elucidado la estructura del producto mayoritario mediante técnicas espectroscópicas, y determinado su efecto fungicida. El objetivo de esta investigación es determinar el potencial de su aplicación como plaguicida más respetuoso con el ser humano y el medio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Plaguicidas

Durante los últimos 50 años, la población mundial se ha duplicado, mientras que la tierra cultivable disponible sólo ha aumentado alrededor del 10%. Para satisfacer las necesidades de una población en crecimiento, la producción de cultivos ha tenido que aumentar significativamente. Una forma de mejorar la disponibilidad de alimentos consiste en reducir las pérdidas causadas por plagas, cuyo manejo, desde la década de 1960, se ha basado principalmente en el uso de plaguicidas sintéticos [1].

La FAO define los plaguicidas como «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte» [2]. Sin embargo, los pesticidas también son potencialmente tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente, siendo responsables de aproximadamente 200.000 muertes por intoxicación aguda cada año [3].

1.2. Plaguicidas Naturales

Aunque sin duda han ayudado a aumentar el rendimiento de los cultivos, los efectos negativos de los pesticidas químicos sobre el medio ambiente, la salud humana y la sociedad en su conjunto, son cada vez mayores. Además, los plaguicidas empleados actualmente en la industria alimentaria, imponen costos sustanciales a los gobiernos. Es

por todo ello que se ha producido un auge en la investigación de plaguicidas de origen natural (bioplaguicidas) para su uso habitual en agricultura.

Las plantas terrestres (más de 250000 especies reconocidas) sintetizan una gran cantidad de metabolitos diferentes con estructuras únicas. Éstas, al ser organismos sésiles, han tenido que desarrollar mecanismos de defensa frente a sus depredadores, los cuales incluyen insectos, hongos fitopatógenos, bacterias, virus y otros animales. La evidencia acumulada indica que algunos de sus metabolitos son importantes como parte de las defensas vegetales y, resulta cada vez más evidente, que estos mecanismos de defensa no están sustentados en un solo tipo de sustancia, sino que las plantas generan una gran diversidad de metabolitos, los cuales son el resultado de millones de años de evolución. Con lo cual, no es de extrañar que la mayoría de las sustancias para las cuales se ha descrito una actividad de repelencia contra insectos, y demás parásitos, hayan sido aisladas de plantas [4].

El empleo de plaguicidas de origen botánico se remonta al menos a dos milenios atrás en la antigua China, Egipto, Grecia y la India. Incluso en Europa y América del Norte se reporta el inicio del empleo de estos plaguicidas de origen botánico más de un siglo antes de la aparición de los plaguicidas sintéticos. En la actualidad, los plaguicidas sintéticos han relegado a los de origen botánico a pesar de todas las dificultades que puede traer consigo su uso como envenenamiento de aplicadores, trabajadores de la agricultura y consumidores de alimentos contaminados, muerte de peces y aves, destrucción de hábitats naturales, contaminación de agua, riesgos potenciales para la salud humana y ambiental, y la aparición de resistencia por parte de las plagas.

En las últimas décadas, se han llevado a cabo un gran número de acciones regulatorias para manejar el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos, debido a todos sus efectos perjudiciales, y con el surgimiento de las mismas, se ha incrementado la necesidad de productos capaces de controlar las plagas que afectan a la agricultura sin, o con muy reducidos, efectos negativos medioambientales y sobre la salud humana [5].

Así, actualmente, la búsqueda de métodos de protección de cultivos se centra en productos de origen vegetal, aunque también se exploran otras alternativas como el empleo de bacterias, virus y nematodos. En los últimos años la literatura descubre cientos

de compuestos aislados a partir del metabolismo secundario de las plantas que han mostrado actividad plaguicida (entre otras) y, que podrían ser una alternativa de eliminar, en gran medida, el uso de los tóxicos plaguicidas sintéticos [6].

1.3. Productos Naturales

Por productos naturales entendemos todos los compuestos orgánicos provenientes del metabolismo de los organismos vivos, como respuesta a las condiciones externas a las que se encuentra sometido. Estos difieren de especie a especie, con lo que encontramos entre ellos una gran diversidad estructural y funcional. Muchos ya han demostrado su potencial para la obtención de productos de uso humano, ya que, por ejemplo, un gran número de fármacos se ha desarrollado a partir de los mismos [7]. Así, hoy en día sabemos que las posibilidades que abre la investigación de estos productos son infinitas y no se restringen solo al sector farmacéutico. Las posibilidades comerciales de los productos naturales van desde la fabricación de desinfectantes para la industria química hasta la creación de edulcorantes y aromatizantes en la alimentación, pasando por la síntesis de plaguicidas, hasta la elaboración de fragancias en cosmética.

1.4. Flora Endémica Canaria

Pese a la reducida superficie del archipiélago canario, éste presenta una gran biodiversidad. En la actualidad, se puede contabilizar cerca de 15000 especies diferentes, si incluimos en este recuento flora y fauna. Respecto a lo que nos atañe, la flora, las plantas son el grupo más numeroso; las islas albergan más de 4000 especies, entre nativas y endémicas, integradas por musgos, helechos, gimnospermas y angiospermas, donde se clasifica *Salvia canariensis* L. Esta característica es la que ha hecho que en los 90 se definiera a la región como “hotspot of biodiversity” (punto caliente de biodiversidad), junto con otras 35 regiones alrededor del mundo [8]. En el año 2000, la organización Conservation International, estableció que para que un área cumpla con esta definición debe tener, al menos, 1500 plantas vasculares como endémicas y un 30% o menos de su vegetación natural original (es decir, tiene que haber perdido al menos un 70% de su vegetación primaria) [9].

1.4.1. Género *Salvia*

Como salvias se conoce a las plantas del género *Salvia*, perteneciente a la familia Lamiaceae. Comprende cerca de 1000 especies diferentes, que están ampliamente distribuidas en regiones cálidas y templadas del mundo, principalmente América del Sur y Central, Asia Central y del Este y el Mediterráneo [10].

En la actualidad, son ampliamente utilizadas en todo el mundo en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, pero sus beneficios se conocen desde la antigüedad. La palabra “salvia” deriva del latín “salvere”, que significa “salvar”. Esto puede dar una idea de que su uso como planta medicinal viene desde muy atrás en el tiempo. Hipócrates (siglo IV A.C.) hace referencia a sus aplicaciones en ginecología en sus tratados y Plinio El Viejo (siglo I) a sus múltiples usos medicinales en su obra “*Historia Naturalis*”.

Las salvias presentan una composición química compleja con abundantes metabolitos de naturaleza terpénica, fundamentalmente diterpenos y triterpenos, así como compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, todos con diferentes funciones biológicas y terapéuticas reconocidas [11]. A los terpenos se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antitumorales, mientras que los flavonoides se presentan como antioxidantes, antimutagénicos y anticarcinogénicos [12][13].

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio fitoquímico de las hojas de *Salvia canariensis* L., mediante fraccionamiento bioguiado, en la búsqueda de potenciales agentes plaguicidas, concretamente, fungicidas. Con el fin de cumplir con este propósito, nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Preparación de un extracto mediante maceración con etanol de las hojas de *S. canariensis* L.
2. Fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico usando disolventes de polaridad creciente: *n*-hexano, acetato de etilo y agua.
3. Evaluación de la actividad fungicida del extracto y las fracciones frente a hongos fitopatógenos.
4. Fraccionamiento bioguiado de la fracción más activa mediante sucesivas cromatografías en columna de gel de sílice.
5. Identificación y caracterización de los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
6. Evaluación de la actividad fungicida del producto mayoritario.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este TFG ha sido realizado en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO-AG) en la Universidad de La Laguna.

Siguiendo los objetivos planteados en este Trabajo de Fin de Grado, el primer paso a seguir fue la preparación del extracto crudo etanólico de las hojas de *S. canariensis* L. que recolectamos en Gáldar, Gran Canaria.

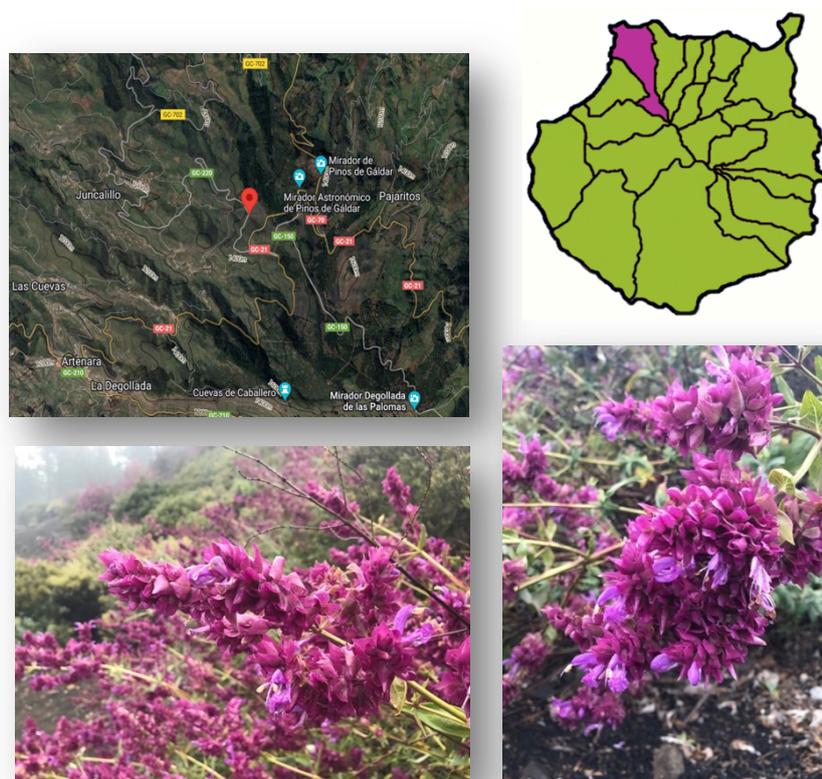


Figura 1. Zona de recolección del material vegetal y detalle de las flores de *Salvia canariensis* L.

El proceso que seguimos para la preparación del extracto etanólico consistió en una maceración sucesiva de 24 horas que se repitió 3 veces, tal y como se detalla en la parte experimental. La selección de *Salvia* como objeto de estudio se basó en el uso tradicional de la misma en el control de plagas de cultivos y en los datos recogidos en la literatura del estudio fitoquímico de diferentes especies de *Salvia*, que han demostrado la presencia de una amplia variedad de metabolitos secundarios en sus hojas, como diterpenos y triterpenos, con una gran diversidad de actividades biológicas, entre ellas, fungicida.

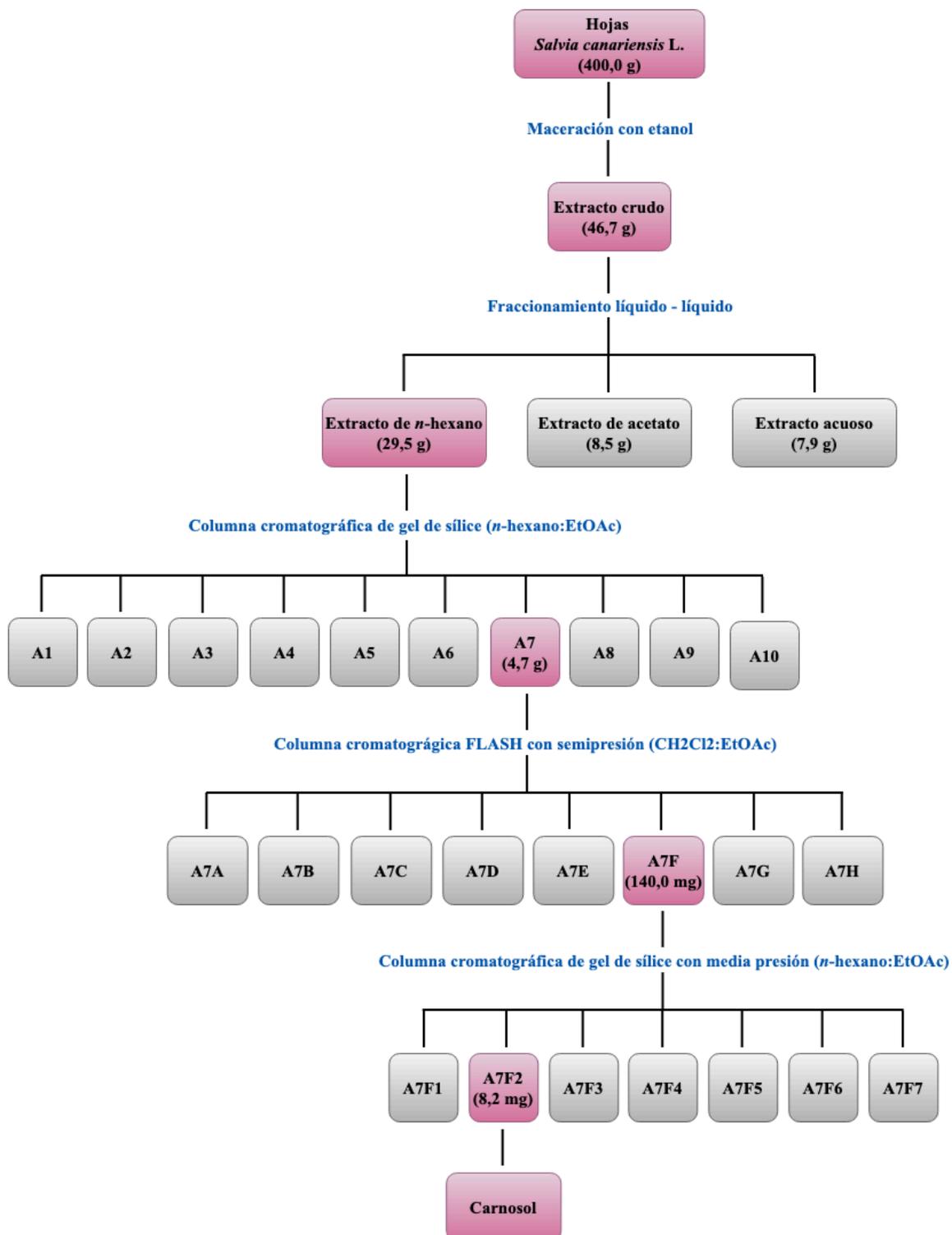


Figura 2. Esquema de extracción y fraccionamiento bioguiado de *Salvia canariensis* L.

Posteriormente, se llevó a cabo el fraccionamiento líquido-líquido del extracto crudo, usando disolventes de diferente polaridad, *n*-hexano, acetato de etilo y agua. El estudio de la actividad biológica de estas fracciones reveló que mientras el extracto acuoso era inactivo, tanto el extracto de *n*-hexano como el de acetato de etilo presentaban actividad fungicida.

Tabla 1. Actividad fungicida (% inhibición) del extracto etanólico y las fracciones resultantes del fraccionamiento líquido-líquido del extracto crudo de *Salvia canariensis* L. frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

Muestra	<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
Extracto EtOH	46,70 ± 0,70	44,61 ± 1,30	27,36 ± 2,54	62,16 ± 4,36	56,23 ± 3,90	35,13 ± 7,83	47,95 ± 1,82	44,76 ± 1,17	33,21 ± 1,93
Fracción <i>n</i>-hexano	59,51 ± 1,92	58,31 ± 1,85	60,55 ± 1,88	86,27 ± 2,88	83,93 ± 4,57	69,14 ± 2,89	65,54 ± 2,20	69,94 ± 4,09	46,85 ± 2,07
Fracción AcOEt	57,37 ± 2,29	52,71 ± 3,01	34,64 ± 1,35	78,10 ± 2,51	75,36 ± 5,34	58,54 ± 11,73	56,08 ± 1,76	49,92 ± 2,94	33,04 ± 4,76
Fracción acuosa	NA	ND	ND	NA	ND	ND	NA	ND	ND

DE: desviación estándar. NA: no activo. ND: no determinado

Se decidió continuar el trabajo con la fracción más activa frente a los tres hongos fitopatógenos – la fracción de *n*-hexano – al objeto de identificar el producto o productos responsables de la actividad. Para ello realizamos sucesivas cromatografías en columna de dicho extracto, aislando así el producto mayoritario **P1**.

Para el fraccionamiento cromatográfico en columna [14] del extracto de *n*-hexano empleamos como disolvente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo en polaridad creciente, con lo que obtuvimos 10 fracciones (A1-A10), que fueron reunidas según su similitud en cromatografía de capa fina. La actividad biológica de estas fracciones se evaluó y resultaron activas las fracciones A4 a A9.

Tabla 2. Efecto fungicida (% inhibición) de las subfracciones resultantes de la cromatografía en columna de la fracción de *n*-hexano frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

Muestra	<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
A1	14,64 ± 6,37	ND	ND	17,41 ± 14,13	ND	ND	23,26 ± 11,31	ND	ND
A2	-27,25 ± 14,16	ND	ND	-38,81 ± 20,54	ND	ND	-7,34 ± 16,04	ND	ND
A3	-6,75 ± 5,66	ND	ND	13,00 ± 13,63	ND	ND	6,97 ± 8,82	ND	ND
A4	63,99 ± 2,74	57,92 ± 6,76	40,40 ± 7,87	97,29 ± 4,61	93,81 ± 2,92	80,70 ± 4,82	66,26 ± 3,23	58,28 ± 4,81	43,26 ± 6,53
A5	54,31 ± 7,46	51,88 ± 12,30	10,36 ± 9,19	84,27 ± 4,20	78,19 ± 14,04	10,21 ± 17,47	53,22 ± 6,64	43,14 ± 6,63	35,25 ± 4,75
A6	73,41 ± 7,12	61,16 ± 6,54	55,07 ± 7,51	86,64 ± 5,21	81,61 ± 3,37	73,93 ± 4,26	77,30 ± 8,57	65,33 ± 4,30	55,09 ± 2,91
A7	74,33 ± 6,00	57,15 ± 7,15	34,84 ± 6,10	95,32 ± 1,80	90,35 ± 4,61	86,59 ± 4,81	71,63 ± 5,73	59,86 ± 7,63	8,55 ± 10,10
A8	68,74 ± 4,25	53,96 ± 4,80	48,90 ± 5,89	84,60 ± 4,99	82,45 ± 6,56	66,85 ± 4,36	82,98 ± 6,06	59,30 ± 4,71	38,05 ± 7,22
A9	66,98 ± 7,35	60,89 ± 4,71	48,79 ± 4,77	91,06 ± 2,79	86,32 ± 7,33	81,87 ± 3,04	84,40 ± 5,87	69,94 ± 5,14	54,70 ± 5,28
A10	0,76 ± 7,82	ND	ND	-44,71 ± 24,86	ND	ND	17,73 ± 11,74	ND	ND
A11	41,98 ± 5,65	ND	ND	24,29 ± 5,90	ND	ND	80,14 ± 8,02	ND	ND

DE: desviación estándar. ND: no determinado (aquellas fracciones que presentaron un % de inhibición < 30% a concentración de 1 mg/mL no se evaluaron a concentraciones inferiores).

Se seleccionó la fracción más activa (A7) para continuar con el estudio fitoquímico. Ésta se sometió a un nuevo fraccionamiento en columna FLASH con media presión, usando como disolvente una mezcla de diclorometano/acetato de etilo en polaridad creciente. A este procedimiento le siguieron sucesivos fraccionamientos en columna hasta que, finalmente, obtuvimos el producto mayoritario **P1**, del cual fue evaluada su actividad. El producto puro se evaluó a concentraciones de 0,1; 0,05 y 0,01 mg/mL.

Tabla 3. Efecto fungicida (% de inhibición) del producto **P1** aislado de las hojas de *S. canariensis* L. frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

<i>A. alternata</i>			<i>B. cinerea</i>			<i>F. oxysporum</i>		
1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,1 mg/mL
52,35 ± 3,48	38,94 ± 3,70	ND	11,67 ± 10,89	9,73 ± 11,55	ND	48,88 ± 5,00	48,69 ± 4,19	ND

ND: no determinado (aquellas fracciones que presentaron un % de inhibición < 30% a concentración de 1 mg/mL no se evaluaron a concentraciones inferiores).

La estructura del producto mayoritario **P1**, se determinó mediante técnicas espectroscópicas de RMN¹H y RMN¹³C (incluyendo experimentos bidimensionales, HMBC y HSQC) y espectrometría de masas [15]. A continuación, pasamos a discutir la elucidación estructural del producto **P1**. Éste se aisló como un sólido amorfo de fórmula molecular C₂₀H₂₆O₄, calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) y datos de RMN¹³C.

Tabla 4. Datos de RMN¹H (CDCl₃, 600 MHz) y RMN¹³C (CDCl₃, 150 MHz)

Posición	δ _C , CDCl ₃	Posición	δ _H , CDCl ₃
1 (CH ₂)	29,2	1 (H ₂)	α: 2,22 (td) β: 2,41 (d)
2 (CH ₂)	18,9	2 (H ₂)	α: 2,00 (m) β: 2,20 (m)
3 (CH ₂)	41,0	3 (H ₂)	α: 1,25 (dt) β: 1,51 (d)
4 (C)	34,5	-	-
5 (CH)	45,5	5 (H)	2,02 (dd)
6 (CH ₂)	29,7	6 (H ₂)	α: 2,21 (ddd) β: 2,03 (t)
7 (CH)	77,16	7 (H)	5,36 (dd)
8 (C)	134,8	-	-
9 (C)	121,7	-	-
10 (C)	48,4	-	-

Posición	δ _C , CDCl ₃	Posición	δ _H , CDCl ₃
11 (CH)	141,8	C - O - H	5,35 (s)
12 (C)	141,1	C - O - H	5,80 (s)
13 (C)	132,9	-	-
14 (CH)	112,3	14 (H)	6,64 (s)
15 (CH)	27,3	15 (H)	2,90 (m)
16 (CH ₃)	22,3	16 (H ₃)	1,23 (d)
17 (CH ₃)	22,4	17 (H ₃)	1,24 (d)
18 (CH ₃)	19,7	18 (H ₃)	0,91 (s)
19 (CH ₃)	31,7	19 (H ₃)	0,86 (s)
20 (C)	175,8	-	-

Datos en δ (¹H) basados en experimentos HSQC. Si no se indica multiplicidad es que son señales solapadas. J en paréntesis expresada en Hz. Datos en δ (¹³C) basados en experimentos DEPT y HSQC.

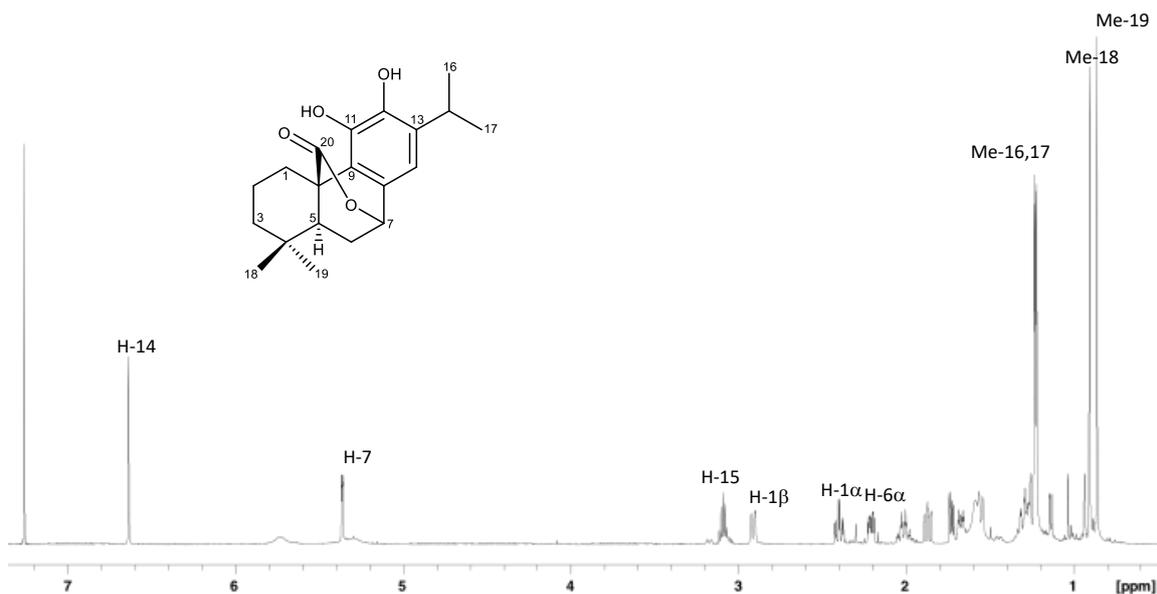


Figura 3. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 600 MHz) de **P1** (carnosol).

El RMN¹H presentó como señales más características, un protón aromático como singlete a 6,63 δ , un protón germinal a un oxígeno a 5,35 δ ($J = 1,4; 3,9$ Hz), así como dos metilos como singletes a 0,86 y 0,91 δ y dos metilos como dobletes a 1,24 y 1,24 δ .

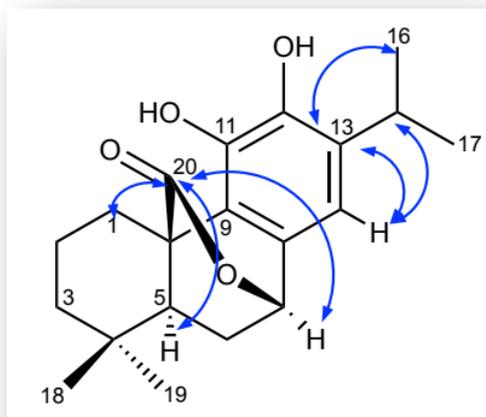


Figura 4. Estructura química del carnosol con correlaciones HMBC en flechas de color azul.

En su espectro de RMN¹³C y experimentos DEPT se observaron señales para 20 átomos de carbonos, distribuidos en cuatro metilos, cuatro metilenos, cuatro metinos y ocho carbonos cuaternarios. Presenta como señales características un carbono de un grupo

carbonilo a 175,8 δ y 6 carbonos aromáticos, uno de ellos olefínico (112,3 δ). Además, se observó un carbono olefínico unido a oxígeno a 77,16 δ .

Estos datos y la comparación con los existentes en la bibliografía están de acuerdo con una estructura de diterpeno con esqueleto de abietano. La disposición de los distintos grupos funcionales sobre el esqueleto se determinó mediante el estudio de un experimento HMBC.

Así se correlacionan a larga distancia, el protón H₂-1, H-7 y H-5 con el carbono del grupo carbonilo C-20, que nos permitió situar la lactona entre los carbonos C-7 y C-10. La correlación entre los metilos 16 y 17 con el C-13 y de H-14 con C-13 y C-15 nos permitió situar el grupo isopropilo sobre C-13. Esta información y comparando con los datos en la bibliografía, permitió identificar **P1** como 11,12-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-20,7 β -olida (carnosol), un diterpeno orto – difenólico con un esqueleto de abietano, grupos hidroxilos en posición C-11 y C-12 y una lactona en el anillo B [16].

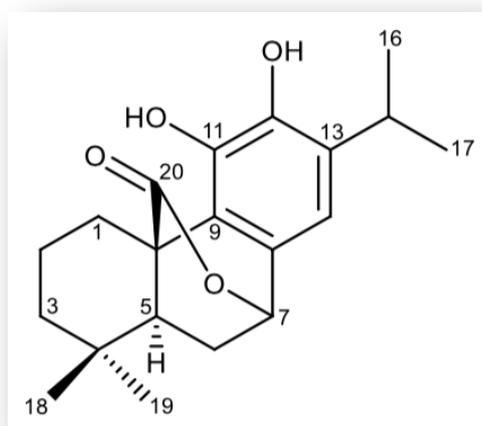


Figura 5. Estructura química del 11,12-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-20,7 β -olida (carnosol).

4. CONCLUSIONES

El fraccionamiento bioguiado de las hojas de *Salvia canariensis* L. realizado en el presente Trabajo de Fin de Grado nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. El extracto etanólico de las hojas de *Salvia canariensis* L. resultó activo frente a hongos fitopatógenos ensayados.
2. La fracción de *n*-hexano fue la más activa de las obtenidas del fraccionamiento líquido-líquido del extracto etanólico.
3. Siguiendo el fraccionamiento bioguiado, obtuvimos el producto mayoritario **P1**, que presenta actividad fungicida *in vitro*, siendo más activo frente a *A. alternata* y *F. oxysporum* que a *B. cinerea*.
4. La estructura de **P1** se determinó mediante técnicas espectroscópicas (RMN, COSY, HSQC y HMBC) y espectrométricas.
5. Se realizó la elucidación estructural del compuesto mayoritario **P1**, que fue identificado por comparación de los datos físicos y espectroscópicos existentes en la bibliografía como el diterpeno con esqueleto de abietano, 11,12-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-20,7 β -olida (carnosol).
6. El fraccionamiento bioguiado es una metodología eficaz para la búsqueda de las moléculas responsables de la actividad.
7. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la especie *Salvia canariensis* L. es un prometedor agente plaguicida, más respetuoso con el ser humano y el medio ambiente.
8. El carnosol aislado de *Salvia canariensis* L. se perfila como candidato para posibles estudios posteriores dirigidos a investigar su potencial uso en planes integrados de control de plagas.
9. Se ha adquirido conocimiento y destreza en técnicas de aislamiento y elucidación estructural de productos naturales.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Recolección de material vegetal

Las hojas de *Salvia canariensis* L. se recolectaron en junio de 2019, en el municipio de Gáldar, Las Palmas de Gran Canaria, en Los Pinos de Gáldar, en el cruce que conduce hacia Artenara y Juncalillo, carretera GC220 (28°02'10" N, 15°37'30" W, 1415 m.a.s.l.). Un ejemplar testigo con número de pliego TFC 53.328, identificado por la botánica Cristina Montelongo, técnico responsable del Herbario TFC (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, está depositado en dicha instalación.

5.2. Extracción y fraccionamiento de las hojas de *Salvia canariensis* L.

Las hojas (400,0 g), secadas en un ambiente oscuro y seco y molidas, se extrajeron con 4L de etanol absoluto (Supelco, Merck) por maceración (1 g:10 mL) a temperatura ambiente y con agitación, durante 24 horas. El macerado resultante se filtró por gravedad en un filtro de pliegues y se eliminó el disolvente en el rotavapor, a 40 °C y baja presión. Este proceso se repitió dos veces más y finalmente, se obtuvo 46,7 g de extracto crudo. A partir del extracto crudo, mediante extracción líquido-líquido y usando los disolventes en orden de polaridad creciente, se obtuvieron las fracciones de *n*-hexano (29,5 g), EtOAc (8,5 g) y agua (7,9 g).

5.3. Fraccionamiento cromatográfico

El extracto de *n*-hexano de hojas de *Salvia canariensis* L. se fraccionó mediante columna cromatográfica de gel de sílice, de 500 mL, usando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo, de polaridad creciente (10:0 a 8:2) y un último lavado con metanol. Se recogieron 11 fracciones de 500 mL, que se reunieron en 10 (A1-A10), tras su análisis por cromatografía de capa fina. De cada una de ellas, tomamos aproximadamente 20 mg, que se evaluaron para la determinación de su actividad fungicida.

La fracción A7 se sometió, de nuevo, a fraccionamiento cromatográfico. La cromatografía se realizó en columna FLASH de 500 mL con semi-presión. Como fase móvil usamos una mezcla de diclorometano-acetato de etilo de polaridad creciente (10:0 a 0:10). De esta separación, se obtuvo un total de 47 fracciones que se reunieron en 8 (A7A – A7H) tras su estudio mediante cromatografía de capa fina.

A7F se fraccionó por cromatografía húmeda en columna de gel de sílice con media presión, obteniéndose en este caso 120 fracciones que se reunieron en 7 (A7F1 – A7F7). Por último, la fracción A7F2 fue analizada por cromatografía en capa fina y por RMN¹H y RMN¹³C.

5.4. Datos espectroscópicos

RMN¹H (CDCl₃) δ	0,86 (3H, s, Me-19); 0,91 (3H, s, Me-18); 1,23 (3H, d, $J = 13,2$ Hz, Me-16); 1,24 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, Me-17); 1,25 (1H, dt, $J = 3,0; 13,6$ Hz, H-3 α); 1,51 (1H, d, $J = 13,3$ Hz, H-3 β); 2,00 (2H, m, H-2 α); 2,02 (1H, dd, $J = 5,6; 10,4$ Hz, H-5); 2,03 (1H, t, $J = 12,7$ Hz, H = 6 β); 2,20 (2H, m, $J = 2,8; 13,4$ Hz, H-2 β); 2,21 (2H, ddd, $J = 4,2; 5,3; 13,5$ Hz, H-6 α); 2,22 (1H, td, $J = 4,1; 12,9$ Hz, H-1 α); 2,41 (2H, d, $J = 12,8$ Hz, H-1 β); 2,90 (1H, m, $J = 6,5$ Hz, H-15); 5,35 (1H, s, $J = \text{C-OH}$); 5,36 (1H, dd, $J = 1,1; 3,8$ Hz, H-7); 5,80 (1H, s, C-OH); 6,64 (1H, s, H-14).
--	---

RMN¹³C (CDCl₃) δ	18,9 (t, CH ₂ -2); 19,7 (q, CH ₃ -18); 22,3 (q, CH ₃ -16); 22,4 (q, CH ₃ -17); 27,3 (d, CH-15); 29,2 (t, CH ₂ -1); 29,7 (t, CH ₂ -6); 31,7 (q, CH ₃ -19); 34,5 (s, C-4); 41,0 (t, CH ₂ -3); 45,5 (d, CH-5); 48,4 (s, C-10); 77,16 (d, CH-7); 112,3 (d, CH-14); 121,7 (s, C-9); 132,9 (s, C-13); 134,8 (s, C-8); 141,1 (s, C-12); 141,8 (s, C-11); 175,8 (s, C-20).
---	--

EM de alta resolución	Calculado para C ₂₀ H ₂₆ O ₄ 330,1831; observado 330,1855.
------------------------------	---

5.5. Técnicas experimentales

5.5.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas

5.5.1.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrofotómetros Bruker Avance (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C) y/o Bruker Avance 600 (600 MHz para ^1H y 150 MHz para ^{13}C). El producto se disuelve en cloroformo deuterado (CDCl_3), usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los experimentos se llevaron a cabo a 300 K.

Se utilizaron los programas y secuencias de pulsos de ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC y HMBC de la casa Bruker. El procesamiento y el análisis de los espectros de RMN, se efectuó con el programa TopSpin™ versión 2.1. y 3.2. de Bruker. En los experimentos de RMN ^1H la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas correspondientes a singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c) y multiplete (m). En los experimentos RMN ^{13}C la multiplicidad de los carbonos se expresa como: metílicos (c), metilénicos (t), metínicos (d) y cuaternarios (s).

5.5.1.2. Espectrometría de masas de alta resolución

Las determinaciones de las fórmulas moleculares de fragmentos y de iones fueron realizadas en un espectrofotómetro VG MICROMASS ZAB-2F (a potenciales de 15 o 70 CV), y FISONS INSTRUMENTS modelo VG Autospec.

5.5.2. Técnicas cromatográficas

5.5.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Las cromatografías en capa fina, con fines analíticos y preparativos, se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄, con soportes de

plástico y de aluminio. La detección de productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleoum (disolución de H₂O-H₂SO₄-AcOH 4:1:20) y posterior calentamiento a 120°C.

Con fines preparativos, se emplean placas idénticas pero de 1 mm de espesor. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz UV a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleoum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada.

5.5.2.2. Cromatografía en columna (CC)

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0,063-0,200 nm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. El gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con bomba de vacío. La muestra se puede añadir disuelta o adsorbida en gel de sílice de 0,2-0,5 nm de diámetro.

5.6. Programas informáticos

La estructura presentada en la memoria se dibujó con el programa ChemDraw Ultra, versión 20.0 de PerkinElmer, CambridgeSoft. El procesamiento de los espectro de RMN se llevó a cabo con el programa TopSpin 3.6.1. de Bruker.

5.7. Ensayos biológicos

La evaluación de la actividad fungicida del producto puro y extracto y fracciones obtenidos durante el fraccionamiento, se llevaron a cabo por los miembros del equipo de investigación CIPEV (Control integrado de plagas y enfermedades de los vegetales) de la Universidad de La Laguna. Los ensayos de la actividad fungicida se llevaron a cabo siguiendo la metodología implementada por el grupo de investigación. [17] Resultados expresados en % inhibición.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Köhler, H.R. y Triebkorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341 (6147), 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- [2] Food and Agriculture Organization [FAO]. (2010). *Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas*. FAO.
- [3] Svensson, M., Urinboyev, R., Wigerfelt Svensson, A., Lundqvist, P., Littorin, M. y Albin, M. (2013). *Migrant Agriculture Workers and Their Socio-economic, Occupational and Health Conditions – A Literature Review*. [Universidad de Lund]. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.2297559>
- [4] Burillo, J. y González, A. (2009). *Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural*. Gobierno de Aragón, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria.
- [5] Pérez López, E (2012). Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16 (1), 51-59. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209125190002>
- [6] Nava Pérez, E., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J.R. y Vázquez Montoya, E.L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8 (3), 17-29. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46125177003.pdf>
- [7] Gutiérrez Ravelo, Á. y Estévez Braun, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103 (2), 409-419. <https://rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>
- [8] Instituto de Productos Naturales y Agrobiología [IPNA]. (19 de enero, 2021). La naturaleza que inspiró a los fármacos. *Blog Instituto de Productos Naturales y Agrobiología*. <https://www.ipna.csic.es/blog/la-naturaleza-que-inspiro-los-farmacos>

- [9] Santillán, M.L. (2020) Los Hotspots de Biodiversidad, regiones insustituibles en el planeta. *Ciencia UNAM*. <https://ciencia.unam.mx/leer/1060/los-hotspot-de-biodiversidad-regiones-insustituibles-en-el-planeta>
- [10] Georgiev, V. y Pavlov, A. (2018). *Salvia biotechnology*. Springer.
- [11] Valera Molina, A. y Santos Guerra, A. (2002). *Investigaciones fitoquímicas en plantas canarias*. Fundación Ramón Areces.
- [12] Ortega, T., Carretero M. E., Villar, A. M., (2002). Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. *Elsevier*, 16 (1), 59-64. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-salvia-fitoquimica-farmacologia-terapeutica-13034818>
- [13] Lipp, F.J. (2002). *Herborismo. Tradición, simbolismo y uso de las plantas medicinales en oriente y occidente*. Taschen.
- [14] Csáky, A. y Martínez, M.A. (2012). *Técnicas experimentales en síntesis orgánica*. Síntesis.
- [15] Hesse, M., Meier, H., y Zeeh, B. (1997). *Métodos espectroscópicos en química orgánica*. Síntesis.
- [16] Gajhede, M., Anthoni, U., Nielsen, H.P., Pedersen, E.J. y Christophersen, C. (1990). Crystal structure, absolute configuration and spectroscopic properties of a diterpene. *Journal of Chemical Crystallography*, 20, 165-171. <https://doi.org/10.1007/BF01160970>
- [17] Bailen, M., Julio, L.F., Diaz, C.E., Sanz, J., Martínez-Díaz, R.A., Cabrera, R., Burillo, J. y Gonzalez-Coloma, A. (2013). Chemical composition and biological effects of essential oils from *Artemisia absinthium* L. cultivated under different environmental conditions. *Industrial Crops and Products*, 49, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.055>

7. ANEXO. ESPECTRO DE RMN

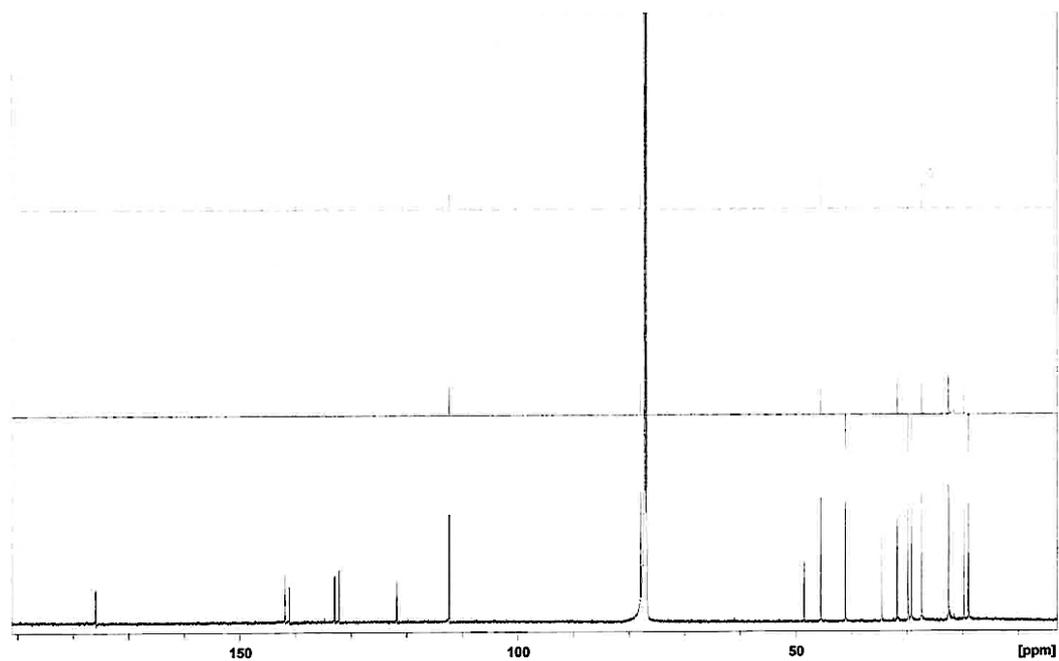


Figura 6. Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 150 MHz) de **P1** (carnosol).

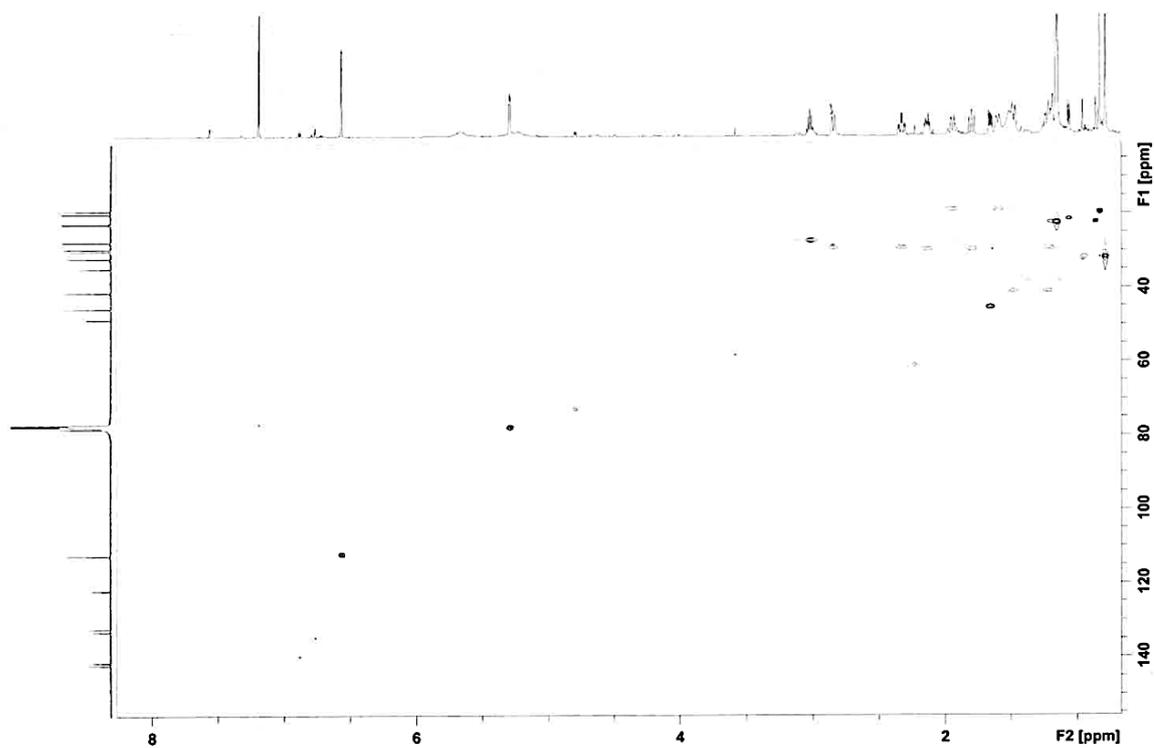


Figura 7. Experimento HMBC de **P1** (carnosol).

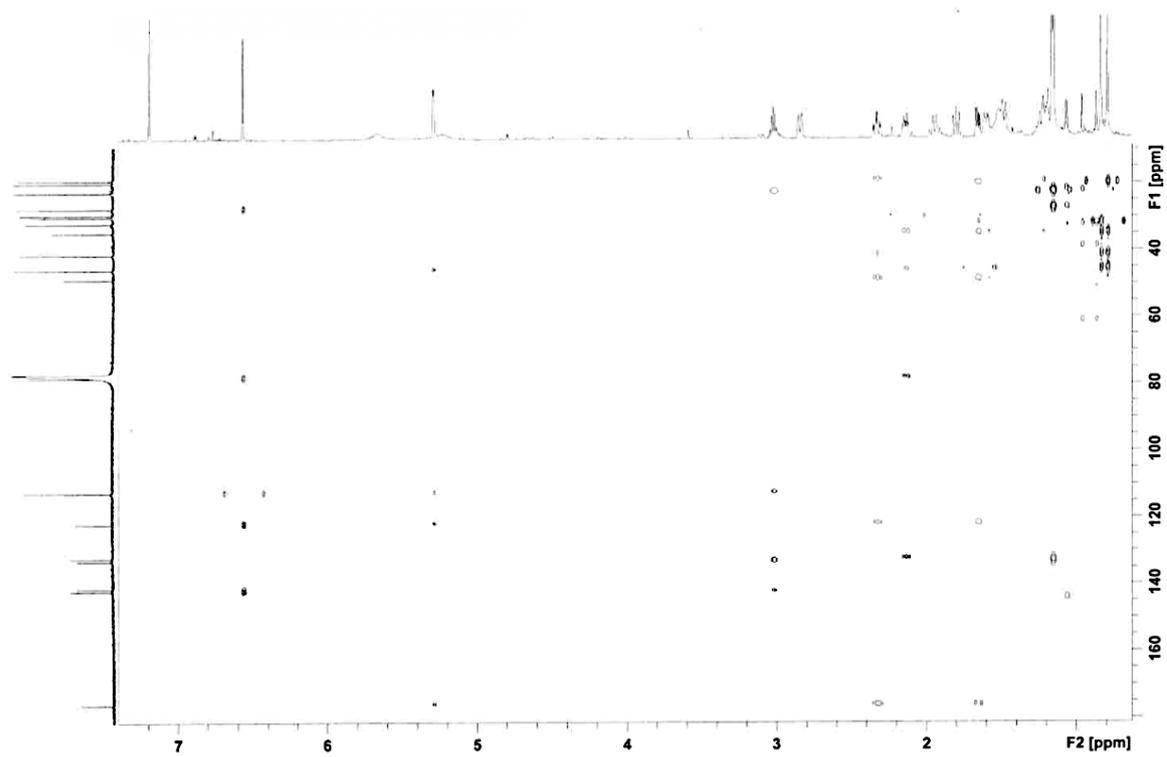


Figura 8. Experimento HSQC de **P1** (carnosol).